

(Translation)

Reference (C)

Japanese Patent publication: SHO60-28504

Title: Product Coated with Stabilized Heparin

Disclosure date: July 5, 1985

Abstract:

In medicinal products with an antithrombotic heparin containing surface-coating, the surface-coating additionally contains  $\geq 1$  low-solubility Schiff's base obtained by reaction of a dialdehyde with a primary amine, the molecules of the Schiff's base being interspersed between the heparin molecules in the surface coating. Preferably, the Schiff's base are reaction products of glutaraldehyde and primary 14-22 (preferably 16-18) C alkylamines (especially, amines the ammonium salts of which have a critical micellular concentration of  $5 \times 10^{-3}$  mol/l). The coated prods are for use in situations where they come into contact with blood. The Schiff's base stabilizes the heparin in the surface coating and prevents erosion of heparin from the coating.

BEST AVAILABLE COPY

(C)

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公告

## ⑨ 特 許 公 報 (B 2) 昭60-28504

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 L 31/00識別記号 庁内整理番号  
6779-4C

⑫ 公告 昭和60年(1985)7月5日

発明の数 2 (全9頁)

⑬ 発明の名称 安定化されたヘパリン表面コーティングを有する物品およびその製法

⑭ 特 願 昭51-30722

⑮ 公 開 昭51-12343

⑯ 出 願 昭51(1976)3月19日

⑰ 昭51(1976)11月9日

優先権主張 ⑱ 1975年3月20日 ⑲ スウェーデン(SE) ⑳ 7503240-9

⑳ 発 明 者	ヤン・クリステル・エリグソン	スウェーデン国(18264) ユルスホルム、シンドレグエーゲン3番
㉑ 発 明 者	ロルフ・ラーソン	スウェーデン国(17010) エケリヨ、ラブスグエーゲン7番
㉒ 発 明 者	オーケ・ローセングレ	スウェーデン国(12243) エンシエーデ、エストランズグエーゲン14番
㉓ 発 明 者	マイ・ブリット・イエ	スウェーデン国(14142) フツディング・プレストグエーゲン35番
㉔ 出 願 人	イー・エル・デー・ビ オマテリアル・アクチ エボラーグ	スウェーデン国プロマ・エスー16120、ボックス20105番
㉕ 復代理人	弁理士 佐藤 辰男	外1名
審 査 官	近 藤 兼 敏	

1

## ① 特許請求の範囲

1 ヘパリンと、ジアルデヒドと第一級アミンとの反応により形成される低溶解度のシッフ塩基とからなり、前記シッフ塩基分子が表面コーティング中のヘパリン分子間に分散されて、血液と接触した場合の前記表面コーティングからのヘパリンの離脱を防止する、安定化されたヘパリン表面コーティングを有する物品。

2 ジアルデヒドがOHC-CHOおよびOHC-R-CHO (式中Rは1~4個のCH<sub>2</sub>基を占む) よりなる群から選ばれる、前記第1項記載の物品。

3 ジアルデヒドがグルタルジアルデヒドOHC-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHOである前記第2項記載の物品。

4 第一級アミンがRNH<sub>2</sub> (式中Rは14~22個好ましくは16~18個の炭素原子を含有するアルキルである) タイプのものである、前記第1項記載の物品。

5 第一級アミンのアンモニウム塩が5×10<sup>-8</sup>モ

2

ル/l以下の臨界ミセル濃度を有する、前記第1項記載の物品。

6 ヘパリンを第一級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤で処理して前記ヘパリンの陰イオン性基を閉塞し、そしてそのような閉塞されたヘパリンを含有する表面をジアルデヒドで処理して前記表面中に低溶解度を有するシッフ塩基を形成させそしてヘパリンの陰イオン性基の一部を脱閉塞させることとなる、血液と接触した場合のヘパリンの離脱を防止する安定化されたヘパリン表面コーティングを有する物品の製法。

7 ヘパリンを第一級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤と反応させて、ヘパリンの陰イオン性基が前記陽イオン性表面活性剤により閉塞された不溶性コンプレックス化合物を生成させ、前記コンプレックス化合物を有機溶媒に溶解させ、このようにして生成された溶液をヘパリン処理表面に適用して前記表面上にコーティングを生成させ、前記コーティングから溶媒を蒸発させそして前記

コーティングをジアルデヒドの水性溶液で処理することを包含する、前記第6項記載の製法。

8 トルイジンブルーテストにより指示されるように、ヘパリンのすべての陰イオン性基の実質的に完全な閉塞が起るまでヘパリンを第一級アミンタイプの表面活性剤で処理することを包含する、前記第6項記載の製法。

9 約 $5 \times 10^{-2}$ モル/ℓ以下の臨界ミセル濃度を有する第一級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤を使用することを特徴とする、前記第6項記載の製法。

10 クラフト温度を越える温度において臨界ミセル濃度以上の濃度を第一級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤の水性溶液でヘパリンを処理することからなる、前記第6項記載の製法。

11 ヘパリンを、そのアルキル基中に14~22個、好ましくは16~18個の炭素原子を有するアルキルアミン塩酸塩で処理することからなる、前記第6項記載の製法。

12 閉塞されたヘパリンを含有する表面をグルタルジアルデヒドで処理することからなる、前記第6項記載の製法。

13 このヘパリン層をセチルアミン塩酸塩またはオクタデシルアミン塩酸塩の0.5mM水性溶液と60℃において15分間接触させ、そしてこのようにして製造された表面をグルタルジアルデヒドの0.5%水性溶液と55℃において20分間接触させることからなる、重合体表面にイオン結合によつて結合されたヘパリン層を安定化する、前記第6項記載の製法。

14 100ml当り300mg (40000U) を含有するヘパリン水性溶液100容量部を60℃において、アルキル鎖中に16~18個の炭素原子を含有するアルキルアミン塩酸塩の17.6mM/ℓ水性溶液100容量部と混合し、生成するヘパリンとアルキルアミン塩酸塩との不溶性コンプレックス化合物を溶液から分離し、前記コンプレックス化合物を120容量部のシクロヘキサン中に分散させ、攪拌下64容量部のエタノールを徐々に加え、このようにして生成した溶液に40容量部のシクロオクタンを加え、得られる溶液を戸過し、このようにして得られた溶液を非血栓形成性とされるべき材料の表面に適用して前記材料上に表面コーティングを形成させ、前記表面コーティングから溶媒を蒸発させ、

そしてその表面コーティングをグルタルジアルデヒドの0.5%水性溶液と55℃において20分間接触させることからなる、前記第7項記載の製法。

15 ヘパリンと第四級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤とのコンプレックス化合物の溶液を使用してヘパリン処理表面を生成させる、前記第6項記載の製法。

16 ヘパリンとアルキルアンモニウム塩とのコンプレックス化合物の溶液を使用することによつてヘパリン処理表面を生成させる、前記第6項記載の製法。

17 表面に第一にアルキルアンモニウム塩の溶液で処理し、次にヘパリン溶液で処理することによつてヘパリン処理表面を生成させる、前記第6項記載の製法。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、ヘパリン含有コーティングによつて表面を非血栓形成性ならしめた物品、特に医療材料に関する。またこのようなヘパリン処理表面はまず第一級アミン型陽イオン性表面活性剤に接触させそして次いでジアルデヒドに接触させることによつて安定化される。

医学分野において過去10年間血液に接触する人工材料の使用に関する問題にかなりの関心が払われた。異物表面に接触すると、血液は血管の損傷の場合と同様に反応する。すなわち、蛋白吸着および血小板付着についで血小板の凝集および凝固が起る。従つて異物表面は血栓形成を生ぜしめそしてこれは臨床的二次反応の危険性を構成する。

人工物質の血液との接触に関する二次反応の危険を低下させる目的で、血液と共存しうるいわゆる血栓抵抗性ないし非血栓形成性表面を生成させる努力がなされている。その研究の一つはヘパリンをその表面に結合させるという考えに基づいている。このヘパリンは周知且つ広く利用されている抗凝固剤であり、そしてほとんどの場合そのナトリウム塩の形で存在している。種類の基質へのヘパリンの安定な共有結合形成が試みられている。しかしながら、同時にヘパリンの生理学的活性を損失せしめることなしに共有結合反応を行なわせることはいまだ不可能である。正の陽イオン性基を有する表面に負のヘパリネートイオンをイオン結合させることに基づく別の方法は、それが

ヘパリンの生理学的活性の損失を全く生ぜしめないという利点を有している。しかしながら一方、陽イオン性基含有表面に単にイオン結合されているヘパリンは血漿または血液に接触すると、ある程度は遊離することが確証されている。すなわち無機結合は十分に安定ではない (J. Biomed. Mater. Res. Symposium No. 3 (1972) 第77頁およびRadiology 第109巻第585頁 (1973) 参照)。

スウェーデン特許第365710号明細書および相当する米国特許第3810781号明細書はプラスチック表面の陽イオン性基にイオン結合しているヘパリンを安定化させる方法を記載している。この方法はヘパリン分子間に交叉結合を生成させそしてそれによつて表面からのヘパリンの離脱を防止するという考えに基づいている。ジアルデヒド、主としてグルタルジアルデヒドが交叉結合剤として使用されている。

このジアルデヒドによる安定化処理後の試験は、異なる陽イオン性基がプラスチック表面へのヘパリンのイオン結合に使用された場合には、その安定化効果に差があることを示した。第一級アミンタイプの陽イオン性基すなわち第一級アンモニウム基の使用は、第二級、第三級または第四級各アンモニウム基の使用に比した場合にジアルデヒドで処理されたヘパリン化表面に改善された安定化を与えることが見出されている。

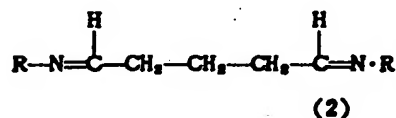
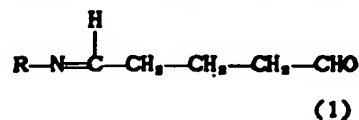
これら結果に基づいて研究を継続したところ、ヘパリン処理表面の改善された安定性は、ヘパリンの陰イオン性基を第一級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤により閉塞し、そして次いでジアルデヒドで処理してヘパリン処理表面に低い水溶性を有するシッフ塩基を形成させそしてヘパリンの陰イオン性基を部分的に脱閉塞させる場合に得られることが示された。

シッフ塩基は特性基  $\text{—N}=\text{C}(\text{H})\text{—CH}_2\text{—}$  を有する化合物である。シッフ塩基はアルデヒドと第一級アミンとの反応によつて形成されるが、しか

しアルデヒドと第二級、第三級または第四級アミンとの間には形成されないことは周知である。本発明の改善された安定化を生ぜしめる反応に関しては何ら特定の理論に拘束されるものではないけれども、以下にどのようにして安定化が達成されようかを説明する。

第一級アミン  $\text{RNH}_2$  (式中Rはアルキルである) がジアルデヒド例えばグルタルジアルデヒド  $\text{OHC—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CHO}$

と反応した場合には、次の2種の化合物

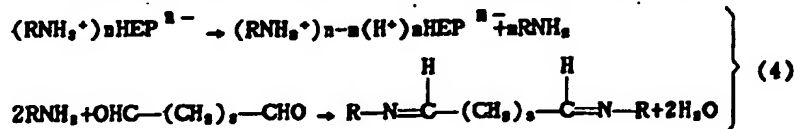


が形成されよう。両者共シッフ塩基である。しかし化合物(1)は若干の水溶性を有しており、他方化合物(2)は非常に低い水溶性を有している。本発明者らは、未反応アルデヒド基を有していない前記(2)の化合物が安定化の原因であると信じている。

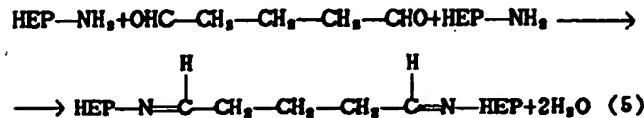
ヘパリン分子は種々の陰イオン性基例えば  $\text{—OSO}_3^-$  および  $\text{—NSO}_3^-$  を含有しており、これらは例えば第一級アルキルアンモニウムイオンと反応して無機結合を形成しう。この反応は次のように説明することができるが、ここでヘパリンイオンは簡単のために単に  $\text{HEP}^-$  として示されている。



すなわち、ヘパリン分子の陰イオン性基は第一級アルキルアンモニウムイオンによつて閉塞されている。この閉塞されたヘパリンとジアルデヒドとの反応は次のように示すことができ、ここにジアルデヒドはグルタルジアルデヒドである。



反応(4)の第一段階はヘパリンの部分的脱閉塞を生じてその生理学的活性を回復させそして第一段アルキルアミン形成を与える。反応(4)の第二段階は前記式(2)に示したタイプのシッフ塩基を形成する結果となる。前記シッフ塩基(2)の分子はヘパリン分子の間に散在している。それらは疎水性を有している。すなわち本発明者らの知るかぎりでは、



本発明の一つの態様によれば、ヘパリン処理表面は相当するアンモニウム塩の形態にある第一段アミンの水性溶液で処理しそして次いでジアルデヒドの水性溶液で処理することによって安定化される。本発明の第二の態様によれば、水性溶液中のヘパリンを相当するアンモニウム塩の形の第一段アミンと反応させて溶解度の低いヘパリンアルキルアンモニウムコンプレックス化合物を形成させる。前記コンプレックス化合物を有機溶媒に溶解させ、この溶液をヘパリン処理すべき表面に適用しそして溶媒を蒸発せしめて表面上にヘパリンアルキルアンモニウムコンプレックス化合物のコーティングを残留せしめる。前記コーティングをジアルデヒドの水性溶液で処理することによって安定化させる。

本発明者らはヘパリン処理された表面を調製するための5種の有用な方法を簡単に記載する。この表面中ではヘパリンは不十分な安定性を有しておりこれは本発明の方法により改善させることができる。ヘパリン処理方法の一層完全な検索はL' Union Medical du Canada 第103巻第71頁(1974)に与えられている。

(1) プラスチック表面をまず陽イオン性表面活性剤溶液で処理しそしてその後で、スエーデン特許第306597号明細書(または米国特許第3634123号明細書)またはTrans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs 第15巻第1頁(1969)に従ってヘパリン溶液で処理する。

(2) ヘパリンと第四級アミンタイプの陽イオン表面活性剤とのコンプレックス化合物を有機溶媒に溶解させる。この溶液を例えばプラスチック、ガラスまたは金属の表面に適用しそして溶

媒を蒸発させる(J. Biomed. Mater. Res. Symposium 第3巻第77頁(1972)およびRadiology 第6巻第280頁(1971)参照)。イソプロピルアルコールに溶解させたヘパリンとベンザルコニウムクロリドのコンプレックス化合物よりなるこのタイプの溶液は市場的に入手可能である。

ジアルデヒドと2個の隣接ヘパリン分子のアミノ基との間の交叉結合反応もまた、ヘパリンの安定化の達成にいくらか重要なものである。前記交叉結合反応は次のように説明することができる。

は、これがヘパリンの溶解を防止している理由である。換言すれば、シッフ塩基の分子はヘパリン分子の除去に対して立体障害を構成する。

(3) 第四級陽イオン性基が化学的に結合された重合体鎖を含有しているプラスチック物質を製造する。あるいはまた第四級陽イオン性基を化学反応によって共有結合的に例えば米国特許第3617344号明細書記載のようにしてプラスチック表面に結合させる。そのあとでヘパリン溶液で処理することによって、ヘパリンをプラスチック表面の陽イオン基にイオン結合させる。

(4) まずアミノシランタイプのカップリング剤をヘパリン処理すべき表面に結合させる。次いでこの表面をヘパリン溶液で処理する。

(5) ヘパリンの濃厚水溶液をヘパリン処理すべき表面に適用しそして次いで水を蒸発させて、膜集性ヘパリンフィルムを表面に形成させる。そのようなヘパリンコーティングは、血液凝固が防止されねばならない場合の血液の臨床分析用ガラスチューブに対して使用されている。

前記(2)、(3)および(5)のヘパリン処理法においては、第一段アミンまたはアンモニウム基は付加されない。方法(2)においてはヘパリン処理表面の成分は、ヘパリンと第四級アミンタイプの陽イオン表面活性剤であり、方法(3)においてはヘパリンと第四級アンモニウム基であり、そして方法(5)においては、ヘパリンのみである。方法(1)によるヘパリン処理法においては、第一段アルキルアンモ

ニウム基はある種の場合すなわち第一級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤溶液が処理の第一段階で使用されている場合にのみ加えられる。(4)のヘパリン処理法においては、第一級アミン基が通常加えられる。方法(1)および(4)により調製されたヘパリン処理表面においては、第一級アミンを加えるのではあるけれども、その表面における第一級アミンまたはアンモニウム基の数は比較的低い。その理由は前記表面をまず第一級アミン剤で処理しそして次いでヘパリンで処理するからである。第一級アミンまたはアンモニウム基数が低い故に、前記表面は単にジアルデヒドで処理することのみによつては完全に安定化できない。

前記(1)〜(5)のいずれかの方法によつて生成されたヘパリン処理表面は本発明によつて安定化させることができる。ヘパリン処理表面を最初に、このヘパリンの実質的にすべての陰イオン性基がアルキルアンモニウムイオンによつて閉塞されるような条件下に第一級アミン剤で処理し、そしてその後でその表面をジアルデヒドで処理することが望ましい。この安定化処理は、そのヘパリンがその完全なる生理学的活性を保有しそして血液または血漿に接触した場合に表面から離脱されることのない、ヘパリン処理表面を生成する。プラスチック材料のみならずその他の物品にも安定化ヘパリンコーティングを生成させることが可能である。方法(2)、(4)および(5)はそのようなコーティングをガラスおよび金属物品にも生成させることを可能ならしめる。

前記(2)のヘパリン処理法においては、その表面層はヘパリンと第四級アンモニウム表面活性剤とのコンプレックス化合物よりなっている。前記コンプレックス化合物を第一級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤の水溶液に接触させた場合には交換反応が起り、その結果ヘパリンと前記表面活性剤との間にコンプレックスを形成し、他方第四級アンモニウム表面活性剤が表面から除去される。これは、第一級アルキルアンモニウムヘパリンコンプレックスの溶解度が第四級アルキルアンモニウムヘパリンコンプレックスのそれよりも低い故である。従つて記載の交換反応とはヘパリンの陰イオン性基が長鎖アルキルアンモニウム陽イオンにより閉塞されることを意味している。第一級アミンタイプの陽イオン性基はヘパリン

を材料の表面に付着させる前にヘパリンに加えることさえもできる。これはヘパリンを水性溶液中で第一級アルキルアンモニウム塩と反応させて低い溶解度を有するヘパリンアルキルアンモニウムコンプレックスを生成させることによつて行なわれる。この反応をヘパリン分子中の実質的にすべての陰イオン性基がアルキルアンモニウムイオンと反応するまで進行させることが望ましい。この反応を完全な閉塞（ブロッキング）を生ぜしめる点まで進行させる最良の方法は、少なくとも溶液中に存在するヘパリンの陰イオン性基の数に相当する量でアルキルアンモニウム塩を存在させそしてその溶液からコンプレックスを沈殿させることである。

このようにして生成されたコンプレックス化合物を溶媒に溶解させそしてこの溶液をヘパリン処理すべき物品に適用する。この溶媒をここで蒸発させて、物品の表面にヘパリンアルキルアンモニウムコンプレックスの薄層を残留せしめる。ヘパリンのすべての陰イオン性基がアルキルアンモニウムイオンと反応したことの保証として、ここにこの物品をアルキルアンモニウム塩の水溶液に接触させることができる。ヘパリン処理表面をここにジアルデヒドの水溶液に接触させることによつて安定化させる。

ヘパリンアルキルアンモニウムコンプレックス化合物に対する溶媒は、無極性溶媒（例えばシクロヘキサン）と極性溶媒（例えばエタノールまたはプロパノールのような低級アルコール）との混合物である。ヘパリンアルキルアンモニウムコンプレックス化合物を好ましくは無極性溶媒に分散させ、そして徐々に極性溶媒を加える。コンプレックス化合物は最初に無極性溶媒中でエマルジョンを形成する。継続して極性溶媒を添加すると、このコンプレックス化合物は溶解するようになる。この溶液を安定化させそして相分離を防止するためには、ここでこの乙種の溶媒の中間の極性を有する可溶化剤の少量を加えることが好ましい。シクロヘキサンとエタノールの混合物を使用する場合にはこの可溶化剤はジクロロエタンでありうる。

ヘパリン陰イオン性基の充分に多数を第一級アルキルアンモニウムイオンと反応させることの重要性は前記に説明されている。反応度は、ヘパリ

ンと反応した場合に特性的呈色を与える指示薬によつて検査することができる。トルイジンブルーの使用が好ましく、これは水に容易に溶解して青色溶液を与える塩である。ヘパリン処理表面を前記溶液に接触させた場合、トルイジンブルーとヘパリンの陰イオン性基との間の反応は桃色を生成する。前記の桃色の強度はヘパリンの生理学的活性の指標である。生理学的活性の一層定量的な測定法はヘパリン処理表面に吸着されたトルイジンブルーから得られるトルイジンブルーの溶液の発色強度の減少を分光学的に測定することである。本発明者らはヘパリンと第一級アルキルアンモニウムイオンとの反応を、その表面をトルイジンブルー試験で検査した際に、桃色がもはや観察できなくなるまで進行させることが好ましいと考える。

充分な数のヘパリンの陰イオン性基が脱閉塞されていることを確認するためのジアルデヒド安定化処理後のヘパリン処理表面の検査に対してもまたこのトルイジンブルー試験は有用である。淡桃色を認めることができた場合には、この脱閉塞過程は満足すべきものである。このトルイジンブルー試験はまたその安定化法が結果的にヘパリンの表面への満足すべき結合を生じたかどうかを検査するにも有用である。仕上った表面を60分間血液または血液に接触させる。トルイジンブルー洗浄後、試験を反復する。低下した呈色強度が観察される場合には、多すぎるヘパリンが表面から遊離されているのである。

トルイジンブルー試験は安定化表面の品質を検査することに対してのみならず、ヘパリン処理表面の第一級アルキルアンモニウム塩による処理およびジアルデヒドによる安定化処理に対する最良の反応条件を見出すためにもまた非常に有用である。種々の濃度溶液および種々の処理温度および時間を使用して実験を行ないそしてトルイジンブルー試験でその結果をチェックすることによつて最良の条件を見出すことができる。

現在市場的に入手可能な第一級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤の中で、本発明者らはなかんずく、アルキル鎖中に8~22個の炭素原子を有するアルキルアミン塩酸塩の本発明による使用を試験した。本発明者らは約 $5 \times 10^{-3}$ モル/ℓ以下の臨界ミセル濃度(CMC)を有する第一級ア

ミンタイプの陽イオン性表面活性剤は、ヘパリン中の陰イオン性基を閉塞してトルイジンブルーとの発色反応が起らないようになしうることを見出した。約 $5 \times 10^{-3}$ モル/ℓ以下のCMCを有するような表面活性剤の使用、およびそれに続くジアルデヒドによる安定化処理はヘパリン処理表面中に低い溶解度の充分量のシッフ塩基の形成を招来し、従つてそしてまたヘパリンの陰イオン性基の部分的脱閉塞を生ずる。

臨界ミセル濃度は、表面活性剤の水性溶液中でミセル様塊化が生ずる最低濃度である。CMCに関するそれ以上の情報は、例えば米国ナショナル・ビュロー・オブ・スタンダーズにより発行された「Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems」(NBS36)中に見出すことができる。

本発明者らは、ヘキサデシルアミン塩酸塩(別名セチルアミン塩酸塩)が第一級アミンタイプの特に有用な陽イオン性表面活性剤であることを見出した。前記トルイジンブルー反応の助けをかりて、本発明者らは、この表面活性剤を離脱可能なヘパリンを含有するヘパリン処理表面の安定化に使用する場合の処理条件を研究した。

すなわち、所望の安定化効果を与えるセチルアミン塩酸塩の水溶液によるヘパリン処理表面は、温度、時間および溶液濃度の広い限度内で達成できることが確認された。しかしこの処理は、問題の陽イオン性表面活性剤の透明な溶液が得られるような温度および濃度条件下に行なうことが好ましい。従つて、臨界ミセル濃度(セチルアミン塩酸塩に対するCMCは $\approx 10^{-3}$ モル/ℓである)が選ばれた場合には、この処理は室温で行なうことができる。 $10^{-3}$ モル/ℓ以下の濃度は一般に不適当である。その理由は充分量の陽イオン性表面活性剤を表面に適用するためには比較的大量の溶液を使用しなくてはならない可能性があるからである。他方かつと少量の溶液の使用が便利の場合そして従つてCMCと飽和濃度の間の濃度が選ばれた場合には、クラフト温度よりも高い処理温度が使用されるべきである。表面活性剤をクラフト温度以上の温度の水に溶解させ、そしてすなわち透明溶液を生成させる。セチルアミン塩酸塩に対してのクラフト温度は約60°Cである。他の第一級アミンタイプの陽イオン表面活性剤を使用する場合

に適当な特定の条件は必要な変更を加えて相当する方法で決定することができる。

表面結合ヘパリンと第一級アミンタイプ陽イオン性表面活性剤との間の反応は水性溶液中では非常に迅速に起るので、数分間の処理時間で一般に充分である。ヘパリン処理表面がヘパリンと第二級、第三級または第四級アミンタイプの表面活性剤とのコンプレックス化合物を含有している場合には、この第一級アミンタイプの表面活性剤の溶液による処理は通常15分間以下の処理時間が満足すべきものであるためには、CMC以上の濃度でそしてクラフト温度以上の温度で行なわれなくてはならない。

ジアルデヒドによる処理は、スウェーデン特許第365710号明細書および相当する米国特許第3810781号明細書に詳細に記載されている方法で達成することができる。すなわち、時間、温度、濃度および溶液pH値に関しては次の限度内である。

時 間	1分～3時間
温 度	20～80℃
濃 度	0.1～25重量%
pH 値	2～10の間

式 $\text{CHO}-\text{CHO}$ または $\text{CHO}-\text{R}-\text{CHO}$  (式中Rは1～4個の $\text{CH}_2$ 基である) のジアルデヒドを使用することが好ましい。グルタルジアルデヒドは特に好ましい。

スウェーデン特許第365710号明細書および相当する米国特許第3810781号明細書中に記載のように、ジアルデヒドはまた相当するアセタールの形で加えることもできる。

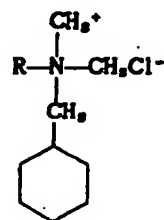
次の実施例は本発明によるヘパリン処理表面の安定化処理および得られる表面の安定性試験のより詳細な記載を与えるものである。

#### 例 1

ヘパリンと第四級アミンタイプの陽イオン性表面活性剤とのコンプレックス化合物の使用により生成されるヘパリン処理表面の安定化

ポリエチレンのカテーテルをイソプロパノールに溶解させたヘパリンベンザルコニウムクロリド

コンプレックスの溶液 (1000IUヘパリン/ml) で処理した。ベンザルコニウムクロリドは一般式



(式中Rは8～18個の炭素原子を含有するアルキルである) を有する化合物である。本例に使用される特定化合物においては、このRは16個の炭素原子を含有している。風乾後、このカテーテルを種々の長さの炭化水素鎖を有する10mMのアルキルアミン塩酸塩の水溶液で65℃において15分間処理した。このようにして処理された試料を次いで0.5%のグルタルジアルデヒド水溶液で55℃において20分間処理した。テストNo.1およびNo.2は対照試料に関するものである。テストはエイカ、ゴデルおよびカイラルフに従ってトリジンプルーとの呈色反応を測定し、そして室温で血液に接触させて60分後に遊離されるヘパリンの量を測定することに基く。

表1から明らかなように、 $\text{C}_{16}$ およびそれ以上の鎖長を有するアルキルアミン塩酸塩の使用によって完全に満足すべき結果が得られた。テトラデシルアミン塩酸塩 ( $\text{C}_{14}$ ) に対するCMCは約  $5 \times 10^{-3}$  モル/l であり、一方ドデシルアミン塩酸塩 ( $\text{C}_{12}$ ) に対するCMCは約  $10^{-2}$  モル/l である。ヘパリンの陰イオン性基の完全な閉塞は  $\text{C}_{16}$  およびそれより短い炭化水素鎖長を使用した場合には達成されない。テストNo.4においてはグルタルジアルデヒド処理の間にNaClが加えられた。そのようなNaCl添加は表1から明らかなとおり、好ましい効果を有しておりヘパリン損失を低下させる。相当するテスト結果は他の材料例えばガラス、金属およびポリテトラフルオロエチレンの表面のヘパリン処理および安定化の場合にも認められる。



表 1

テスト No	アルキルアミン塩酸塩とグルタルジアルデヒド溶液による処理 (10mM, 65°C, 15分)		グルタルジアルデヒド溶液による処理 (0.5%, 55°C, 20分)		グルタルジアルデヒド溶液による処理 (0.5%, 55°C, 20分)		室温で血液に60分間接触させた後のヘパリン損失 (mg/cd)
	アルキルアミン塩酸塩 炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	
1	-	-	-	-	25 · 10 <sup>-3</sup>	-	0.5 · 10 <sup>-3</sup>
2	-	-	+	+	25 · 10 <sup>-3</sup>	8.1 · 10 <sup>-3</sup>	0.7 · 10 <sup>-3</sup>
3	O <sub>14</sub>	5 · 10 <sup>-3</sup>	+	+	0	4.4 · 10 <sup>-3</sup>	0.07 · 10 <sup>-3</sup>
4	O <sub>14</sub>	5 · 10 <sup>-3</sup>	+(1MNaOL)	+	0	4.6 · 10 <sup>-3</sup>	0.02 · 10 <sup>-3</sup>
5	O <sub>18</sub>	10 <sup>-3</sup>	+	+	0	3.1 · 10 <sup>-3</sup>	0.02 · 10 <sup>-3</sup>

## 例 2

ヘパリンとアルキルアミン塩酸塩とのコンプレックス化合物の溶液を使用して生成させたヘパリン処理表面の処理

4000IUに相当する300mgのヘパリンを100mlの蒸留水に溶解させた。このヘパリン溶液をアルキルアミン塩酸塩の17.6mM熱水溶液(60°C) 100mlと混合した。ヘパリンとアルキルアミン塩酸塩との、低溶解度コンプレックス化合物が生成した。前記コンプレックス化合物を遠心力によって前記溶液から分離し、これを次いで120mlのシクロヘキサン中に分散させた。次いで全期間に亘って攪拌しながら64mlのエタノールを徐々に加えた。最後に40mlのジクロロエタンを加えてそしてその後でこの溶液を戸通した。得られた溶液中のヘパリン含量は165IU/ml=1.25mg/mlであった。このようにしてヘパリンと種々の炭化水素鎖長のアルキルアミン塩酸塩とのコンプレックス化合物を含有する数種類の溶液が製造された。

このようにして製造された溶液中に浸すことによつてポリエチレンカテーテルを処理した。この溶液を蒸発により除去した。次いで安定化処理を

15 0.5%グルタルジアルデヒド水溶液を55°Cで20分間使用して行なつた。安定化処理の前および後ならびに室温で25%NaCl溶液に15分間露出させた後、その表面のトリイジンプルーの吸着を測定することによつてその表面をテストした。最後に記したテストは、25%NaCl溶液は不十分に安定化されているヘパリン処理表面からヘパリンを溶解させるので有用である。

表2からわかるように、ヘパリンとC<sub>14</sub>またはそれ以上のアルキル鎖長を有するアルキルアミン塩酸塩とのコンプレックス化合物を使用して完全に満足すべき結果が得られた。またこの表から、ヘパリンの陰イオン性基の閉塞は、CMC≈5×10<sup>-3</sup>モル/Lおよびそれ以下を有するアルキルアミン塩酸塩によつて生成されることが明白である。グルタルジアルデヒド処理の間にNaClが加えられる場合には、5×10<sup>-3</sup>モル/LのCMCを併用したC<sub>14</sub>-アミン塩酸塩に対してその安定化効果は満足すべきものである。相当するテスト結果が、他の材料例えばガラス、金属およびポリテトラフルオロエチレンの表面をヘパリン処理および安定化する場合に得られた。

表 2

テスト No	ヘパリンとアルキルアミン塩酸塩とのコンプレックス化合物 炭素鎖 CNDモル/L		グルタルジアルデヒド溶液による処理 (0.5%, 55°C, 20分)		吸収されたトリイジンプルーの量 (当量ヘパリンmg/cd)		25%NaOL溶液 処理後
	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	炭素鎖 CNDモル/L	
1	O <sub>14</sub>	10 <sup>-3</sup>	+	+	6.6 · 10 <sup>-3</sup>	3.1 · 10 <sup>-3</sup>	0

17

18

2	$C_{14}$	$5 \cdot 10^{-3}$	+	0	$2.8 \cdot 10^{-2}$	0
3	$C_{14}$	$5 \cdot 10^{-3}$	+(1MN <sub>2</sub> C <sub>2</sub> )	0	$2.4 \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^{-2}$
4	$C_{16}$	$10^{-3}$	+	0	$2.0 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$
5	$C_{18}$	$4 \cdot 10^{-4}$	+	0	$1.6 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-2}$
6	$C_{22}$	$4 \cdot 10^{-4}$	+	0	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$0.5 \cdot 10^{-2}$

## 例 3

最初にセチルアミン塩酸塩溶液次いでヘパリン溶液で表面を処理することにより生成されたヘパリン処理表面の安定化

ヘパリン処理はスエーデン特許第306597号明細書および相当する米国特許第3634123号明細書の記載に従って行なわれた。ポリエチレンカテーテルおよびポリウレタンカテーテルを、最初に75°Cで15分間0.5mMセチルアミン塩酸塩水溶液で処理し、その後70°Cで45分間10IU/mlのヘパリン水溶液で処理した。これらのカテーテルとここで再びアルキルアミン塩酸塩の水溶液すなわち

0.5mMのセチルアミン塩酸塩またはオクタデシルアミン塩酸塩の溶液により60°Cで15分間処理した。この安定化処理はここでは0.5%グルタルジアルデヒド溶液を使用して55°Cで20分間行なわれた。このように処理されたカテーテルを、前記セチルアミン塩酸塩またはオクタデシルアミン塩酸塩による処理以外は前記と同一の処理に付したカテーテルと比較した。表3から明らかなように、安定化処理の前の $C_{16}$ および $C_{18}$ アミン塩酸塩溶液による処理は血漿または25%NaCl溶液に接触させた場合のヘパリン損失をかなり減少させる。

表 3

テスト	カテーテル材料 (商標名)	ヘパリン処理後としてグルタル ジアルデヒド安定化前のア ルキルアミン塩酸塩処理 アルキル炭素鎖	室温で15分間血 漿と接触させた後 のヘパリン損失 (IU/ml)	40°Cで10分間25% NaCl溶液と接触さ せた後のヘパリン損失 (IU/ml)
1	ポリエチレン (Kifa)	—	1.6	—
2	ポリエチレン (Kifa)	$C_{16}$	0.02	—
3	ポリウレタン (Gordis)	—	0.2	—
4	ポリウレタン (Gordis)	$C_{16}$	0.02	—
5	ポリエチレン (Portex)	—	—	0.14
6	ポリエチレン (Portex)	$C_{18}$	—	0.03
7	ポリエチレン (Surgimed)	—	0.26	—
8	ポリエチレン (Surgimed)	$C_{16}$	0.01	—

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**